

甜瓜 SRAP 多态性分析及在品种鉴定中的应用

王掌军¹, 王建设², 刘生祥¹

(1. 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021; 2. 国家蔬菜工程技术研究中心, 北京 100089)

摘 要:以国家蔬菜工程技术研究中心甜瓜单倍体育种组提供的 12 份薄皮甜瓜, 30 份厚皮甜瓜, 2 份野生甜瓜为试材, 该研究优化了甜瓜 SRAP 反应体系, 筛选出 10 对引物组合, 分析了甜瓜多态性并对品种进行鉴定。结果表明: 10 μL 反应体系为 $1\times\text{Buffer}$ 1 μL , 引物组合各 20 ng, 模板 DNA 20 ng, dNTPs 2.0 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶 0.2 U。10 对引物组合在 2 份甜瓜上共扩增出 166 条带, 其中多态性条带 104 条, 每对引物组合平均能扩增出 10.4 个多态性位点。甜瓜间遗传距离在 0.08~0.79 (平均为 0.357), 54 份甜瓜被分为二大类: I 类包括 1 份印度野生甜瓜和 3 份哈密瓜; II 类可再分为 2 个亚类: II-1, 是 12 份薄皮甜瓜; II-2, 包括 1 份中国野生甜瓜和 37 份厚皮甜瓜。引物组合 m21e01、m21e10 和 m21e11 区分率分别高达 79.6%、81.5% 和 79.6%, 有助于品种的高效鉴定。

关键词:甜瓜; SRAP; 多态性; 品种鉴定

中图分类号:S 652 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)18-0129-06

甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 属葫芦科 (Cucurbitaceae) 黄瓜属 (*Cucumis* L.) 甜瓜亚属 (*Subgen melo*)^[1]。我国种植甜瓜已有三千多年的历史, 其种植面积逐年扩大, 在世界十大水果中仅次于葡萄、香蕉、柑橘、苹果^[2]。据统计, 我国甜瓜栽培面积和产量均居世界第 1 位^[3]。由于鉴定的形态标记和同工酶标记的数量十分有限, 制约了甜瓜经典遗传与育种科学研究的发展。20 世纪 80 年代, 特别是 20 世纪 90 年代以来, 利用 DNA 分子标记使甜瓜种质资源分子生物学研究领域取得了长足的发展^[4]。随着研究工作的深入, 仍然需要开发高效揭示甜瓜品种遗传差异的新型分子标记。相关序列扩增多态性 (Sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 是一种新型的基于 PCR 标记系统, 由美国加州大学蔬菜作物系 Li 等提出, 又叫基于序列扩增多态性 (Sequence-based amplified polymorphism, SBAP)^[5]。该标记通过独特的引物设计对 ORFs (Open Reading Frames) 进行扩增。上游引物长 17 bp, 5' 端的前 10 bp 是一段填充序列, 紧接着是 CCGG, 组成核心序列及 3' 端 3 个选择碱基, 对外显子进行特异扩增。下游引物

长 18 bp, 5' 端的前 11 bp 是一段填充序列, 紧接着是 AATT, 组成核心序列及 3' 端 3 个选择碱基, 对内含子区域、启动子区域进行特异扩增。因不同个体、物种的外显子、内含子、启动子及间隔区长度不同而产生多态性。该标记具有简便、稳定、中等产率、便于克隆测序目标片段的优点。此外, SRAP 标记的是采用复性变温法来进行扩增, 即开始的 5 个循环中复性时采用 35℃ 的低温以确保引物与靶序列的配对, 之后的 35 个循环中则将复性温度提高至 50℃ 以确保指数式扩增。此标记已在多种植物中试验过, 并应用于遗传图谱构建^[6-7]、遗传多样性评价^[8-9]、基因标记^[10-11]、基因差异表达分析^[12-13], 以及在杂种优势研究方面有零星应用^[14]。该研究优化了甜瓜 SRAP 反应体系, 利用筛选的 10 对多态性引物组合分析甜瓜多态性及对品种进行鉴定, 旨在开发高效揭示甜瓜品种遗传差异的新型分子标记。

1 材料与方法

1.1 试验材料

54 份甜瓜 (编号 1~12 为薄皮甜瓜, 30 份厚皮甜瓜, 2 份野生甜瓜) 由国家蔬菜工程技术研究中心甜瓜单倍体育种组提供, 其名称、形态分类及来源见表 1。

SRAP 引物由上海博亚生物技术有限公司合成, 尿素购于 Promerger Company, ACR-BIS 购于北京欣金科公司, *Taq* DNA 聚合酶和 dNTPs 购自天根生化科技 (北京) 公司, Marker 由华美生物技术公司合成; 美国 PE9600 PCR 扩增仪, 美国 Sigma 离心机, 法国吉尔森微量移液器。

第一作者简介:王掌军 (1978-), 男, 硕士, 讲师, 现从事植物分子遗传育种研究工作。E-mail: wangzj-gs@126.com。

基金项目:国家“863” 高科技发展计划资助项目 (2002AA244021); 北京市重大科技合同资助项目 (H022020130130); 宁夏大学科学研究基金重点资助项目 (NDZR10-9); 宁夏大学农学院青年教师科研项目。

收稿日期:2011-06-02

表 1
Table 1
54 份甜瓜的来源及形态分类
Provenances and morphology classification of 54 *C. melon*

编号 Number	名称 Name	分类 Classify	来源 Source	编号 Number	名称 Name	分类 Classify	来源 Source	编号 Number	名称 Name	分类 Classify	来源 Source
1	盛开花	香瓜	山西	19	4A1045	无网纹	新疆	37	4A1282	无网纹	内蒙古
2	五龙白	香瓜	黑龙江	20	4A657	无网纹	美国	38	4A1345	无网纹	台湾
3	白莎蜜	香瓜	黑龙江	21	4A664	无网纹	山东	39	4A1344	无网纹	内蒙
4	红城脆	香瓜	辽宁	22	4A669	无网纹	日本	40	3A827	哈密瓜	新疆
5	黄金道	香瓜	辽宁	23	4A704	无网纹	甘肃	41	3A832	哈密瓜	新疆
6	灰鼠子	香瓜	辽宁	24	4A887	无网纹	日本	42	3A829	哈密瓜	新疆
7	银莎蜜	香瓜	山东	25	4A1004	无网纹	新疆	43	3A823	哈密瓜	新疆
8	富丰绵菜瓜	菜瓜	河南	26	4A1386	无网纹	内蒙	44	4A1573	哈密瓜	新疆
9	富丰酥菜瓜	菜瓜	河南	27	4A901	无网纹	北京	45	4A1569	哈密瓜	新疆
10	一窝猴	菜瓜	河北	28	2A737	无网纹	荷兰	46	3A825	哈密瓜	新疆
11	黑皮棱子	菜瓜	河北	29	4A914	无网纹	俄罗斯	47	皇后	哈密瓜	新疆
12	八棱菜瓜	菜瓜	河北	30	4A942	无网纹	甘肃	48	4A1588	网纹	以色列
13	4A41	网纹	泰国	31	4A932	无网纹	韩国	49	4A1576	哈密瓜	新疆
14	4A45	网纹	日本	32	4A985	无网纹	山东	50	4A1579	哈密瓜	新疆
15	3B136	网纹	台湾	33	4A1355	无网纹	甘肃	51	4A1572	哈密瓜	新疆
16	4A312	网纹	新疆	34	金蛋子	无网纹	甘肃	52	小金丽	哈密瓜	新疆
17	4A124	网纹	日本	35	1223	无网纹	韩国	53	马抱	野生甜瓜	河北
18	A174	网纹	台湾	36	3A1274	无网纹	内蒙古	54	PI4141723	野生甜瓜	印度

1.2 试验方法

1.2.1 甜瓜基因组 DNA 提取 称取甜瓜嫩叶 1 g, 采用 CTAB 方法^[15], 略加改动提取 DNA, 根据经验公式: DNA 含量 = $A_{260} \times 50$, 计算 DNA 含量。最后将 DNA 浓度稀释成 10 ng/ μ L, 放入 -20℃ 冰箱备用。

1.2.2 SRAP 优化的反应体系、扩增和电泳 参照甜瓜反应体系优化方法^[16]。基础反应体系为 10 μ L, 扩增缓冲液 1 \times Buffer 为 1 μ L, 引物用量各为 10 ng, dNTPs 浓度为 2.0 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶为 0.5 U, 模板 DNA 为 20 ng, 最后用重蒸水补充到 10 μ L。反应热循环为: 预变性 94℃, 5 min; 预扩增程序 94℃ 1 min, 35℃ 1 min, 72℃ 1 min, 5 个循环; 扩增程序 94℃ 1 min, 50℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 5 min; 最后保存在 4℃。反应液扩增产物 5 μ L 在 1 \times TBE、6.0% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 采用银染方法显影后将胶自然风干, 结果扫描于电脑进行分析。

1.2.3 SRAP 引物筛选 将组配的 280 对引物组合用 2 个模板 DNA 逐一筛选, 记录条带清晰、有多态性的引物组合编号, 将该引物组合再重复 1 次, 验证其可靠性, 如果能够清晰、稳定重复出多态性, 记录下引物组合、多态性条带数、条带总条数、在模板上的分布及分子量大小, 以备用于多态性分析和品种鉴定。

1.2.4 数据统计与分析 SRAP 的扩增产物以 0、1、9 统计建立数据库^[17]。在相同迁移位置, 有带的记为 1, 无带的记为 0, 扩增失败或缺失数据记为 9。将这些数据输入 Statistica 聚类统计软件中进行聚类分析, 获得

聚类图。遗传相似系数 (Genetics similarity, GS) 按公式 $GS = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$ 计算, 其中 N_{ij} 表示基因型间共有带数目, N_i 和 N_j 表示 2 个种质的条带数目; 遗传距离 (Genetics distance, GD) 按公式 $GD = 1 - GS$ 计算; 聚类分析按 UPGMA (Unweighted pair group method arithmetic average) 方法, 应用 Statistica 统计软件中 Analysis 命令进行聚类作图。

2 结果与分析

2.1 SRAP 反应体系的优化

2.1.1 引物组合和模板 DNA 用量对甜瓜扩增反应的影响 在 10 μ L 反应体系中, 引物组合对扩增反应的影响, 见图 1(A)。引物组合用量分别各为 5、10 ng 时, 虽扩增出的主、次条带数较多, 但亮度很暗, 模糊不清; 当分别各为 15、25 ng 时, 主带扩增清晰, 但次带暗淡且条带数减少; 当为 20 ng 时, 扩增产物清晰、条带数较多, 效果最优, 故引物组合用量确定为各 20 ng。模板 DNA 设定为 5、10、15、20、25 ng 5 个梯度, 见图 1(B)。当 DNA 用量为 5、10 ng 时, 虽扩增出的主带清晰, 但次带亮度很暗、模糊不清; 用量为 25 ng 时, 主、次带数减少并亮度很暗; 用量为 15、20 ng 时, 主、次带亮度加强, 次带数也增多 (20 ng 时效果尤为明显)。确定 20 ng 模板为反应较为适宜用量。

2.1.2 dNTPs 和 *Taq* DNA 聚合酶浓度对甜瓜 SRAP 扩增反应的影响 在设定的 dNTPs 浓度范围内, 见图 1(C)。当 dNTPs 浓度在 2.5、3.0、3.5 mmol/L 时, 扩增条带数少, 且主带亮度较暗, 次带出现弥散; 浓度在

1.5、2.0 mmol/L 时,扩增的主、次带亮度较强,且次带条带数较多,相比较之下,2.0 mmol/L 时效果最优,故 dNTPs 浓度确定为 2.0 mmol/L。*Taq* DNA 聚合酶浓度梯度设定为 0.1、0.2、0.3、0.4 和 0.5 U,见图 1(D)。*Taq* 聚合酶是 SRAP 扩增反应中非常关键的因素。当 *Taq* DNA 聚合酶浓度为 0.3、0.4 U 时,主带虽清晰,但次带扩增不清晰且条带数少;当浓度为 0.1、0.2、

0.5 U 时,条带扩增稳定,并主、次带亮度较强。综合考虑试验效果与试剂用量,确定 *Taq* DNA 聚合酶浓度为 0.2 U。据此建立了 SRAP 优化反应体系(10 μ L):扩增缓冲液 1 \times Buffer 为 1 μ L,引物组合用量各为 20 ng,模板 DNA 20 ng, dNTPs 浓度为 2.0 mmol/L, *Taq* DNA 聚合酶为 0.2 U,最后用重蒸水补充到 10 μ L。

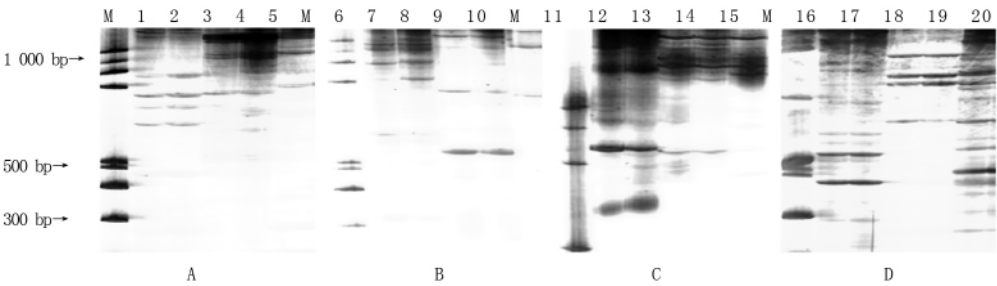


图 1 甜瓜 SRAP 反应体系中主要因素影响

注:A:1~5 引物组合用量分别是 5、10、15、20、25 ng;B:6~10 模板 DNA 用量分别是 5、10、15、20、25 ng;C:11~15 dNTPs 浓度分别是 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mmol/L;D:16~20 *Taq* DNA 聚合酶浓度分别是 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 U;M 分子量从下至上分别是 100~1 000 bp Ladder。

Fig. 1 Effect of main components using SRAP reaction system in *C. melon*

Note:A:1~5 express the amount of each primer combination was 5,10,15,20,25 ng respectively;B:6~10 template DNA amount were 5,10,15,20,25 ng;C:11~15 dNTPS concentrations were 1.5,2.0,2.5,3.0,3.5 mmol/L;D:16~20 *Taq* DNA polymerase concentrations were 0.1,0.2,0.3,0.4,0.5 U;M molecular weight bottom up was from 100 to 1 000 bp ladder.

2.2 甜瓜 SRAP 多态性引物筛选

引物组合逐一用 2 份地域差异较大材料(马泡、PI4141723)DNA 进行筛选,结果 280 对引物组合中 249 对都有扩增,占 88.93%,可扩增出 4~27 条带。其中,239 对引物组合扩增条带虽然清晰,可在 2 份甜瓜 DNA 上带型差异很小,多态性很低,10 对引物组合能够清晰、稳定重复出现带型的差异较大。筛选出 10 对引物组合扩增的统计结果(表 2),10 对引物组合共扩增出 166 条带,平均每对能扩增出 16.6 条带,其中

有多态性条带 104 条,占 62.65%,平均筛选出的每对引物组合能扩增出 10.4 个多态性位点,m21e01 能够扩增出 14 个多态性位点。m21e21 虽仅扩增出 10 条带,但都能扩增出多态性位点,引物组合扩增多态性位点数为 7~14 个,10 对引物组合多态性条带在两模板上分布分别为 48.08%、51.92%,比例为 1:1.08,扩增的 DNA 条带分子量主要集中在 100~1 000 bp,图 2 是 10 对引物组合在 2 份甜瓜上扩增结果。

表 2 10 对引物组合扩增统计结果

Table 2 The statistical result of 10 pairs of primer combinations amplifying

引物组合名称 Primer name	碱基序列 (5'-3')	多态性条带分布 Polymorphism band		总条带数 Total number of band	引物组合名称 Primer name	碱基序列 (5'-3')	多态性条带分布 Polymorphism band		总条带数 Total number of band
		马泡	PI4141723				马泡	PI4141723	
m21e01	TGAGTCCAAACCGGTTA GACTGCGTACGAATTAAA	8	6	27	m30e10	TGAGTCCAAACCGGTGT GACTGCGTACGAATTACT	4	8	18
m21e10	TGAGTCCAAACCGGTTA GACTGCGTACGAATTACT	7	4	15	m30e30	TGAGTCCAAACCGGTGT GACTGCGTACGAATTGT	6	7	19
m21e11	TGAGTCCAAACCGGTTA GACTGCGTACGAATTACG	4	5	14	m31e21	TGAGTCCAAACCGGTGC GACTGCGTACGAATTTTA	5	4	15
m21e20	TGAGTCCAAACCGGTTA GACTGCGTACGAATTTAG	5	8	19	m31e50	TGAGTCCAAACCGGTGC GACTGCGTACGAATTGAT	4	3	11
m21e21	TGAGTCCAAACCGGTTA GACTGCGTACGAATTTTA	3	4	10					
m21e30	TGAGTCCAAACCGGTTA GACTGCGTACGAATTTGT	4	5	18	总计		50	54	166

注:M 分子量从下至上分别是 100~1 000 bp Ladder。
Note:M molecular weight bottom up was from 100 to 1 000 bp ladder.

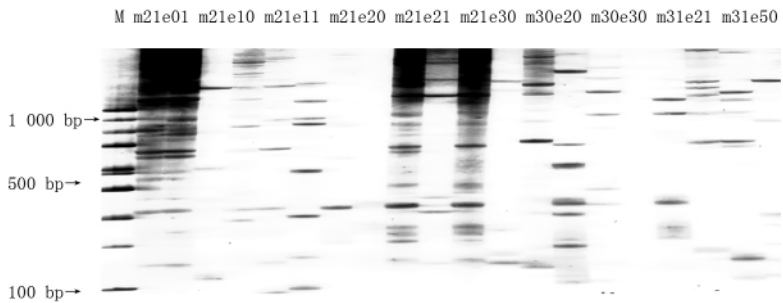


图 2 引物组合在 2 份甜瓜 DNA 上扩增结果

Fig. 2 The amplified result of primer combinations in two *C. melon*

2.3 甜瓜遗传多态性分析及品种鉴定

2.3.1 SRAP 标记分析甜瓜种质遗传多样性 10 对 SRAP 引物组合在 54 份甜瓜上共扩增出 99 重复性好、清晰的条带,多态性条带分子量在 100~1 000 bp 之间;平均每对引物组合的扩增带数为 9.9 条,平均多态性条带比率(PPB)为 68.81%。将产生的 5 346 份数据输入 Statistica 统计软件。应用 Upgma 方法中的遗传最大距离矩阵选项计算得到 54 份甜瓜种质的遗传距离矩阵(GD)。总体上,54 份甜瓜的遗传距离的变幅在 0.08~0.79 之间,平均 GD 值为 0.375,其中,在薄皮甜瓜品种之间,遗传距离变幅在 0.08(编号 4 和编号 10)到 0.31(编号 6 和 12)之间,说明遗传差异相对较小,配组预期产生较弱的杂种优势;在薄皮甜瓜与厚皮甜瓜品种之间,遗传距离变幅在 0.26(编号 3 和 14)到 0.71(编号 1 和 54)之间,即使在厚皮甜瓜品种之间,遗传距离变幅也在 0.10(编号 38 和 47)到 0.79(编号 50 和 54)之间,说明遗传差异相对较大,配组预期产生较强的杂种优势。用 Cluster Analysis 命令,选用 Upgma 的聚类方法,对 54 份甜瓜的 SRAP 标记数据进行聚类,得到聚类图(图 3)。54 份甜瓜大体上分为了二类: I 类,包括 1 份印度野生甜瓜(编号 54)和 3 份哈密瓜(编号为 44、49、51);II 类可以再分为 2 个亚类:II-1,包括 12 份薄皮甜瓜(编号为 1、2、3、6、4、10、5、9、7、11、12、8);II-2,包括 1 份中国野生甜瓜(编号 53)和 37 份厚皮甜瓜(编号为 13、17、14、16、15、28、23、30、18、19、24、20、21、22、26、33、35、36、48、34、37、41、45、29、39、27、42、40、43、46、31、32、38、47、50、25、52)。值得指出的是:12 份薄皮甜瓜均聚在 II-1 类中,说明香瓜与菜瓜的亲缘关系很近,与事实相符,公认香瓜和菜瓜均起源于东亚薄皮甜瓜起源中心;有 3 份哈密瓜(编号为 44、49、51)与印度野生甜瓜 PI 414723 聚在 I 类中,说明这 3 份哈密瓜的原始祖先与印度野生甜瓜 PI 414723 的亲缘关系相对较近。其它 10 份厚皮甜瓜(编号 41、45、42、40、43、46、47、50、52、53)在 II-2 类中聚在一起;7 份网纹甜瓜均分布在 II-2 类中,其中 5 份(编号

13、17、14、16、15)聚在一起,其它 2 份(编号 18、48)聚在无网纹甜瓜中,可能这 2 份网纹甜瓜含有无网纹甜瓜的血统;21 份无网纹甜瓜均聚在 II-2 类中,其中 7 份(编号 29、39、27、31、32、38、25)散布在 II-2 类的哈密瓜中,说明这 7 份无网纹甜瓜可能具有哈密瓜的血统,其它 14 份无网纹甜瓜(编号 28、23、30、19、24、20、21、22、26、33、35、36、34、37)在聚类图上的分布介于网纹甜瓜和哈密瓜之间,成为中间过渡类型。

表 3 10 对 SRAP 引物组合在 54 份甜瓜上多态性分析结果

Table 3 The polymorphic analysis result of 10 pairs of SRAP primer combinations in 54 *C. melon*

引物名称 Primer name	条带数 Band number /条	多态性带 Polymorphism band/条	多态性带比率 Ratio of polymorphism band/%	区分品种 Variety number distinguish/个	区分率 Distinguish rate/%
m21e01	15	11	73.3	43	79.6
m21e10	12	9	75.0	44	81.5
m21e11	12	11	91.7	43	79.6
m21e20	13	8	61.5	24	44.4
m21e21	9	9	100.0	21	38.9
m21e30	7	3	42.9	9	16.7
m30e10	11	9	81.8	20	37.0
m30e30	7	3	42.9	8	14.8
m31e21	7	6	85.7	23	42.6
m31e50	6	2	33.3	9	16.7
变幅	6~15	2~11	33.3~100.0	8~44	14.8~81.5
均值	9.9	7.1	68.81	24.4	45.18

2.3.2 SRAP 引物组合鉴定甜瓜种质资源 以 54 份甜瓜 DNA 为模板,筛选出的 10 对 SRAP 引物组合分别扩增,每对 SRAP 引物组合扩增的条带数、具有多态性的条带数量以及对 54 份甜瓜区分率均存在差异,其分析结果统计(表 3)。10 对 SRAP 引物组合扩增的条带数量变幅在 6~15 条;多态性条带数量变幅在 2~11 条;多态性带比率在 33.3%~100%;区分品种数在 9~44 个;区分率变幅在 14.8%~81.5%。由表 3 可看出,引物组合 m21e01 共扩增出 15 条清晰条带,11 条

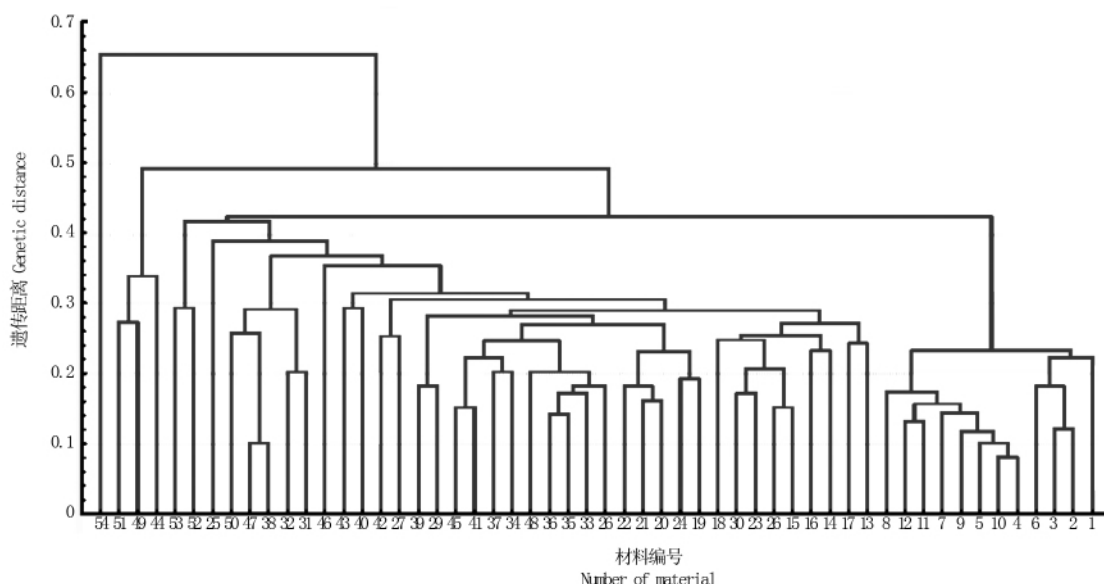


图3 10对SRAP标记扩增54份甜瓜所得聚类图

Fig. 3 The clustering map of 54 *C. melon* based on 10 pairs of SRAP marker

带具有多态性,多态性比率(PPB)达73.3%,能一次性区分出43份甜瓜(1对引物组合聚类图显示,以下同),区分率达到79.6%。m21e10共扩增出12条清晰条带,9条带具有多态性,PPB达75%,能一次性区分出44份,区分率达到81.5%。m21e11共扩增出12条清晰条带,11条带具有多态性,PPB达91.7%,能一次性区分出43份,区分率达到79.6%。m21e20、m21e21、m21e30、m30e10、m30e30、m31e21和m31e50,扩增出清晰条带数分别为13、9、7、11、7、7和6条,带具有多态性条带分别为8、9、3、9、3、6和2条,PPB分别达61.5%、100%、42.9%、81.8%、42.9%、85.7%和33.3%,区分率分别达到44.4%、38.9%、16.7%、37%、14.8%、42.6%和16.7%。显然,m21e01、m21e10和m21e11这3对SRAP引物组合在甜瓜分类学与育种学研究上,将有助于甜瓜种质资源的高效鉴定;在甜瓜种子生产上,将有助于高效鉴定种子真伪与纯度。

3 讨论与结论

SRAP标记是基于PCR的标记系统,因操作简便,使用长17~18 bp的引物以及50℃的退火温度,保证了特异扩增结果的稳定性。通过改变SRAP引物3'端3个选择碱基可得到更多引物,由于上游引物与下游引物可以自由组配,因此用少数的引物可进行多种组合,大大减少了合成引物的费用,同时也大大提高了引物的使用效率。SRAP是一种新型的标记,可真实、充分地揭示植物种质资源多样与否的遗传本质。一方面,SRAP标记是一种解决遗传分类上模糊不清或存在争议问题的方法;另一方面,只要采用合适的引物对组合,SRAP标记可高效地鉴别品种^[18]。一些学者对SRAP应用效率进行了比较研究,在揭示西葫芦的

形态学变异及类型的进化历史一致性方面,SRAP标记提供的信息比AFLP标记更优良^[19]。该研究利用不同的分子标记系统在甜瓜上都能产生各自有效的多态性带,在平均多态性位点、平均多态性条带比率、区分率和遗传距离上:SRAP>DAMD>RAPD,说明SRAP作为一种新型的分子标记技术在甜瓜分子生物学研究中具有十分广阔的应用开发前景。相对而言,SRAP比DAMD和RAPD可检测到更高的遗传变异。在类群关系上,RAPD、DAMD和SRAP标记的聚类结果差异较大,由于不同类型的标记分别扩增不同的基因片段,这也说明了甜瓜种质的变异方式较为复杂。而相关分子鉴别研究结果则表明,SRAP标记比SSR标记可更有效、快捷、经济地鉴别桃^[20]、西红柿^[21]和甘蓝型油菜品种^[22]。

该研究利用优化的甜瓜SRAP反应体系,筛选出了多态性丰富的引物组合,在此基础上,利用SRAP标记进行了甜瓜的多态性分析及品种高效鉴定。甜瓜间遗传距离的变异幅度为0.08~0.79,从聚类结果看,薄皮甜瓜(香瓜和菜瓜)之间的遗传差异相对较小,预期配组杂种优势较弱;而薄皮甜瓜与厚皮甜瓜之间,遗传差异相对较大,预期配组杂种优势较强。然而,在实际育种工作中,薄皮与厚皮甜瓜间杂交只是为了转移某些有益的农艺性状基因(如抗病性、早熟性、低温弱光耐受性等),薄皮甜瓜与厚皮甜瓜之间杂种优势的利用尚未列入甜瓜育种日程,利用方式也有待进一步探讨。在现阶段的甜瓜育种工作中,一般在类内种质间配组,而该研究得知厚皮甜瓜间遗传差异相对较大,杂种优势有待进一步充分地挖掘和利用。m21e01、m21e10和m21e11这3对高分辨率SRAP引物组合的挖掘,在甜

瓜分类学与育种学研究上,将有助于甜瓜种质资源的高效鉴定;在甜瓜种子生产上,将有助于高效鉴定种子真伪与纯度。

参考文献

- [1] 张德水,陈受宜. DNA 分子标记、基因组作图及其在植物遗传育种上的应用[J]. 生物技术通报,1998(5):15-22.
- [2] 马跃. 我国西甜瓜生产回顾与展望[J]. 长江蔬菜,2000(8):4-7.
- [3] 陈雷,秦智伟. 甜瓜采后生理和贮藏保鲜研究进展[J]. 北方园艺,1999(6):24-27.
- [4] Katzir N. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species[J]. Theor Appl Genet,1996,93:1282-1290.
- [5] Li G, Quiros C F. Sequence related amplified polymorphism(SRAP), a new system based on a simple PCR reaction; its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. Theor Appl Genet,2003,106:455-461.
- [6] 王建设,姚建春,刘玲,等. 利用中国香瓜与哈密瓜的 F₂ 群体构建 SRAP 连锁遗传图谱[J]. 园艺学报,2007,34(1):135-140.
- [7] Sun Z, Wang Z, Tu J, et al. Theoretical and applied genetics[J]. Theoretische und angewandte Genetik,2007,114(8):13-17.
- [8] Gulsen O, Karagul S, Abak K. Phenotypic diversity with in a collection of distinct okra (*Abelmoschus esculentus*) cultivars derived from turkish land[J]. Biologia Bratislava,2007,62(1):41-45.
- [9] 王华忠,吴则东,王晓武,等. 利用 SRAP 与 SSR 标记分析不同类型甜菜的遗传多样性[J]. 作物学报,2008,34(1):37-46.
- [10] 邓思立,潘俊松,何欢乐,等. 黄瓜 M 基因连锁的 SRAP 分子标记[J]. 上海交通大学学报(农业科学版),2006,24(3):240-244.
- [11] 陈碧云,伍晓明,陆光远,等. 甘蓝型油菜花瓣缺失基因的图谱定位[J]. 遗传,2006,28(6):707-712.
- [12] Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the

brassica and arabidopsis genomes by direct transcriptome mapping[J]. Theor Appl Genet,2003,107:168-180.

- [13] 马爱芬,李加纳,谌利,等. 甘蓝型油菜种皮色泽相关基因的 cDNA-SRAP 差异显示[J]. 作物学报,2008,34(3):526-529.
- [14] Riaz A, Li G, Quresh Z. Genetic diversity of oilseed Brassica napus inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance[J]. Plant Breeding,2001,120:411-415.
- [15] 文传浩,段昌群,郭涛,等. 一种简单、快捷植物 RAPD 分析 DNA 提取方法[J]. 云南大学学报(自然科学版),2000,22(5):392-393.
- [16] 王掌军,王建设,刘玲,等. 直接扩增甜瓜小卫星 DNA 指纹图谱[J]. 华北农学报,2006,21(3):77-80.
- [17] Nie M, Li W H. Mathe matical modelling for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease [J]. Proceedings of the National Academy of Science,1979,76:5268-5273.
- [18] 王晓菡,郭先锋,孙宪芝,等. SRAP 标记在园艺植物研究中的应用[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2009,40(4):650-654.
- [19] Ferriol M, Pico B, Pascual Fernandez de Cordova, et al. Molecular diversity of a germplasm collection of squash (*cucurbita moschata*) determined by SRAP and AFLP markers[J]. Crop Science, Madison,2004,44(2):653-664.
- [20] Riaz A, Potter D, Stephen M. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers[J]. Amer Soc Hort Sci,2004,129:204-211.
- [21] Ruiz J J, Garcia M S, Pico B, et al. Genetic variability and relationship of closely related Spanish traditional cultivars of tomato as detected by SRAP and SSR markers[J]. Amer Soc Hort Sci,2005,130:88-95.
- [22] 文雁成,王汉中,沈金雄,等. SRAP 和 SSR 标记构建的甘蓝型油菜品种指纹图谱比较[J]. 中国油料作物学报,2006,28(3):233-239.

Analysis of SRAP Polymorphism and Application of Variety Identification in *Cucumis melo* L.

WANG Zhang-jun¹, WANG Jian-she², LIU Sheng-xiang¹

(1. Agricultural College of Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021; 2. National Engineering Research Center for Vegetable, Beijing 100089)

Abstract: The 12 striffen muskmelon, 30u thick-skin muskmelon, 2 wild melon as test materials from melon haploid breeding group of National Engineering Research Center of vegetables SRAP reaction system in *C. melon* were optimized, 10 pairs of filtered primer combinations analyzed polymorphism and identified varieties in *C. melon*. The results showed that the optimum concentration of five important components, i. e. 1×Buffer, primer combinations, template DNA, dNTPs, and *Taq* DNA polymerase in 10 μL reaction system were 1 μL, 20 ng, 20 ng, 2.0 mmol/L and 0.2 U respectively. 10 pairs of primer combinations amplified 166 bands altogether in two *C. melon*, 104 bands were polymorphic, each pair of primer combinations could amplified 10.4 polymorphic locus. The genetics distances (GD) of *C. melon* were between 0.08~0.79 (average GD was 0.375), the 54 *C. melon* were divided two kinds: one concluded 1 India wild melon and 3 Hami melons; the other could divided two sub-kinds, the first was 12 *C. melo* sp. *conomom*, the second was 1 China wild melon and 37 *C. melo* sp. *melo*. The discriminated ratio of primer combinations m21e01, m21e10 and m21e11 were 79.6%, 81.5% and 79.6% in proper order, which would be help for melons to identify high effectively.

Key words: *Cucumis melo* L.; SRAP; polymorphism; variety identification